

生体光電変換素子バクテリオロドプシンの化学修飾による研究

著者	武田 一男
号	943
発行年	1985
URL	http://hdl.handle.net/10097/24739

氏名・（本籍）	たけ　　だ　　かず　　お 武　　田　　一　　男
学　位　の　種　類	理　　学　　博　　士
学　位　記　番　号	理博第　　9　4　3　　号
学位授与年月日	昭　和　60年　9　月　25　日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研　究　科　専　攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）物理学第二専攻
学　位　論　文　題　目	生体光電変換素子バクテリオロドプシンの化学修飾による 研究
論文審査委員	（主査） 教　　授　渡　　辺　　伝次郎　　教　　授　佐　　川　　敬 助　教　授　徳　永　史　生 教　　授　小　西　和　彦

論　文　目　次

第一章	序　　論
第二章	試料の分離精製法
第三章	注目すべきアミノ酸残基の検索
第四章	光反応サイクル中のバクテリオロドプシンにおけるチロシン残基の変化の有無
第五章	光反応中に脱プロトン化するチロシン残基の同定
第六章	プロトンポンプ活性の測定
第七章	光プロトンポンプの分子内機構モデル
付　　録	

論文内容要旨

生命現象を理解するためには、生体によるエネルギー変換機構を分子レベルで理解しなければならない。生体に於いて、エネルギーはイオンの濃度勾配という電気化学エネルギーに一時変換され、その後他のエネルギーに再変換されるという過程をとる事が一般的に知られている。

バクテリオロドプシン (Bacteriorhodopsin ; bR) は、高度好塩菌の細胞膜で紫膜と呼ばれる部分に存在する膜タンパク質である。この bR は、発色団としてレチナール (ビタミン A アルデヒド) を Schiff 塩基結合で有している。光を吸収する事により菌体内から菌体外にプロトン輸送を行なうので、光エネルギーを電気化学エネルギーに変換する生体素子であると bR を考える事ができる。本研究では、この bR の光によるプロトン輸送のメカニズムを解明する事を目的とする。

bR は光を吸収すると、吸収スペクトルの異なる準安定状態 (中間体) を次々と経て再び元に戻る光反応サイクルを行なう。このサイクルに伴ないプロトンが運ばれる。しかし、光を吸収した時に生じる発色団レチナールの変化によって、タンパク質のどの部分のどのような変化が誘起されプロトン輸送が起こるのかは分かっていない。この事を明らかにする為に、bR のタンパク質を化学修飾して変化させ、吸収スペクトルやプロトン輸送の量子収率に対する影響を調べる方法をとった。以下、本論文の内容についての概要を示す。

第一章 序 論

bR の紹介、研究の背景、意義、目的及び研究の概要が述べられている。

第二章 試料の分離精製

以下の各章で共通に用いられる試料の分離精製が述べられている。

第三章 注目すべきアミノ酸残基の検索

bR 中で、光を吸収する部分は、発色団レチナールである。したがって、光により最初に変化する部分はレチナールであり、この変化の影響を受けるアミノ酸残基は発色団近傍のものである。そこで、レチナールの変化の影響を受けるアミノ酸残基の変化は、逆に発色団レチナールに変化を与え、バクテリオロドプシンの吸収スペクトルに変化を与える事が期待される。そこで、どのアミノ酸残基を変化させた時に bR の吸収スペクトルの変化が生じるのかを調べる事にした。但し、プロトン輸送に関与するアミノ酸残基は、プロトン脱着可能な解離基であるはずなので、解離基を有するアミノ酸残基を化学修飾する事にした。bR 中の解離基を有する各種アミノ酸残基をそれぞれ化学修飾した試料のうち、チロシン残基 (Tyr 残基) を化学修飾した試料にのみ bR の吸収スペクトルの変化が観測された。また低温分光法により、Tyr 残基をヨード化した bR の吸収スペクトルの成分分離を行なった結果より、少なくとも 2 個の Tyr 残基が発色団レチナール

と相互作用している事が示された。

第四章 光反応サイクル中のバクテリオロドプシンに於けるチロシン残基の変化の有無

bR が光を吸収した時に、Tyr 残基が脱プロトン化するか否かを、テトラニトロメタンによる Tyr 残基のニトロ化反応（脱プロトン化状態でのみ起こる）を利用して調べた。つまり、暗黒条件下ではニトロ化反応が起こらなくとも、光照射下でニトロ化反応が進行する様な場合があるのかを調べたわけである。その結果、暗黒中ではニトロ化が進行しない低 pH においても、光照射によってニトロ化が進行する事がわかり、光により Tyr 残基の脱プロトン化が起こる事が判明した。しかも、外液の pH が 3 でも光により脱プロトン化が観測され、光により Tyr 残基のプロトン親和性が大きく減少する事を示す結果が得られた。

第五章 光反応中に脱プロトン化するチロシン残基の同定

前章の実験において、光で脱プロトン化した Tyr 残基がニトロ化を受けているから、ニトロ化した Tyr 残基の同定を行えば、脱プロトン化する Tyr 残基を決定できる。bR 中には Tyr 残基が合計 11 個存在するが、その中でどれが光でニトロ化しているのかを、電気泳動法及び質量分析によって調べた。bR はキモトリプシンによって 2 つのフラグメントに分解される。この 2 つのフラグメントのうちどちらの方がニトロ化した Tyr 残基を含んでいるのかを調べるために、2 つのフラグメントで ^{125}I の取り込みを比較した。 ^{125}I はニトロ基と同様に Tyr 残基のオルトの位置にとり込まれるので、すでにニトロ化している Tyr 残基には ^{125}I は取り込まれない又は取り込みが阻害される事を利用し、 ^{125}I の取り込みの比較により、N 末端から 71 番目までのフラグメントにニトロ化した Tyr 残基が存在する事がわかった。さらに、この部分を CNBr で分解し（この場合、メチオニンの部分で切断される）、質量分析を行ない、CNBr で分解したフラグメントのうち、どれにニトロ基の質量数の分だけ増加した質量数が観測されるのかを調べた。この結果、Tyr 64 がニトロ化している事がわかり、また Tyr 26 と Tyr 43 についてはニトロ化している可能性が残された。

第六章 プロトンポンプ活性の測定

光で脱プロトン化する Tyr 残基は、第四章の実験によりニトロ化を受ける。ニトロ化を受けた Tyr 残基は、そのニトロ化の影響として、プロトン親和性が低下している。そこで、光で脱プロトン化する Tyr 残基のニトロ化によるプロトン親和性低下が、プロトン輸送の収率(ϕ)にどのような変化を与えるのかを調べた。人工リン脂質小胞膜に bR 又は光でニトロ化した bR を組み込んだ試料の懸濁液に光照射した時の外液の pH 変化を測定し、その結果、ニトロ化によって ϕ が半減する事、 ϕ の pH 依存曲線が低 pH 側へシフトする事が分かった。以上によって、Tyr 残基の光による脱プロトン化反応は、プロトン輸送の ϕ に関する重要な現象である事が示された。

第七章 光プロトンポンプの分子内機構

bR は、細胞内（C 側）より細胞外（N 側）へプロトンを運ぶ。そこで、bR の C 側 と N 側にプロトン結合部位（各々 A, B とする）の存在を仮定し、A から B へプロトンが移動するとする。A から B へプロトンが移動するためには、その前提条件として、A がプロトン化している事及び B が脱プロトン化している事である。そこで、A, B がプロトン化した状態をとる確率の差に ϕ が比例するという考えが可能であり、これから、 ϕ を表わす以下の式を導出した。

$$\phi \propto \frac{[H^+]_c}{K_a + [H^+]_c} - \frac{[H^+]_n}{K_b + [H^+]_n}$$

但し、

$[H^+]_c$; C 側のプロトン濃度

$[H^+]_n$; N 側のプロトン濃度

K_a ; A の解離定数

K_b ; B の解離定数

この式により、第六章で得た ϕ の pH 依存性を説明出来た（図 1）。この時の A, B のプロトン親和性に対応するパラメータ（pK）を低下させた時の ϕ の変化は、光で脱プロトン化する Tyr 残基のプロトン親和性をニトロ化により低下させた実験で測定された ϕ の変化をうまく説明する事がわかった。そこで、N 側に位置する Tyr 64 が B, C 側に位置する Tyr 26 又は Tyr 43 が A に対応すると考える事ができ、bR の光プロトン輸送において、次の事が起っていると考えられる。

bR が光を吸収すると、Tyr 26 又は Tyr 43 の pK 値が 11.6 より 7.9 へ、Tyr 64 の pK 値が 3 以下に低下し、各々の pK 値の低下量の差がプロトン輸送方向と量子収率を決めている（図 2）。

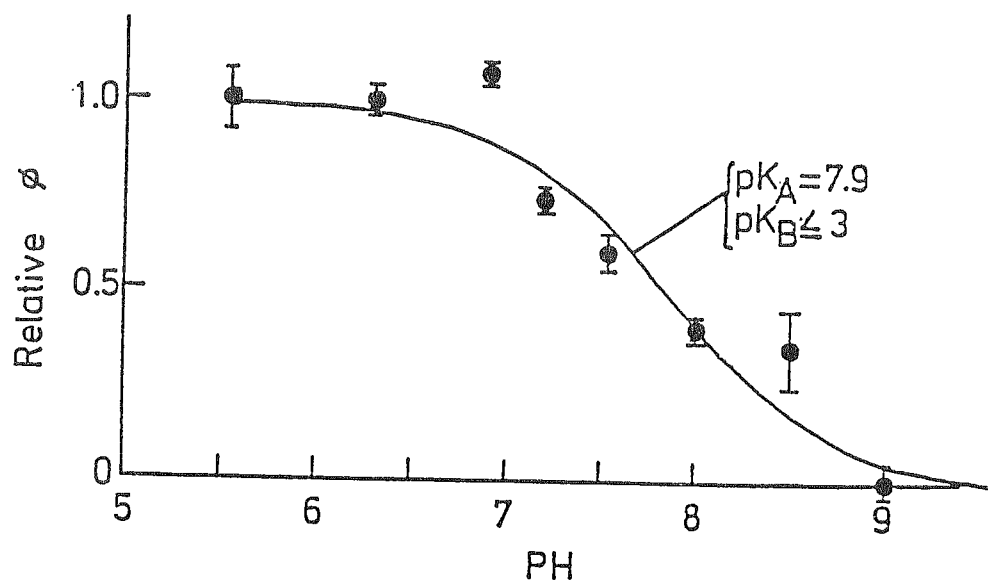


図1 プロトン輸送の収率(ϕ)のpH依存性のモデル系によるシミュレーション

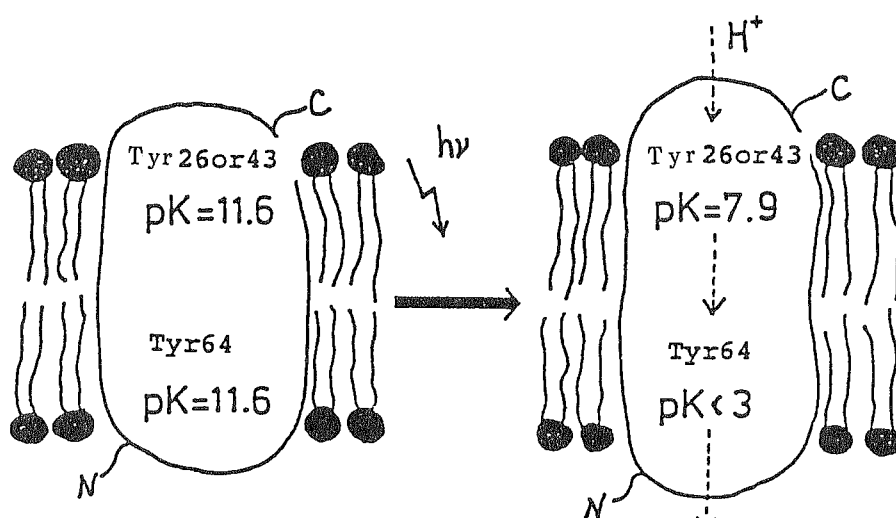


図2 本研究によって予想されるbR中の光吸収後の変化

論文審査の結果の要旨

武田一男提出の博士論文は、生体光電変換素子であるバクテリオロドプシンの光プロトンポンプの分子内機構について、化学修飾法を用いて研究し、新しいモデルを提出したものである。

バクテリオロドプシンは光エネルギーを利用して分子の一方から他方へプロトンを輸送する。結果としてバクテリオロドプシンを含む紫膜をはさんでプロトンの濃度勾配が生じる。それ故、バクテリオロドプシンは一種の光電変換素子とみなせる。本研究ではバクテリオロドプシンのアミノ酸残基の化学修飾により、光プロトンポンプにおいてチロシン残基が重要な役割を果たしていることを明らかにした。次に、チロシンの光ニトロ化反応の pH 依存性の実験から、光照射により、チロシン残基のプロトン解離の pK が大きく下がることを明らかにした。そして、バクテリオロドプシンのペプチド断片を質量分析により解析し、重要な役割を果たすチロシン残基が 26（又は 43）番目（Tyr 26 又は 43）と 64 番目（Tyr 64）であることを同定した。

以上の結果及び光プロトンポンプの pH 依存性の解析から次のような新しいモデルを立てた。「バクテリオロドプシンが光を吸収すると、Tyr 26（又は 43）の pK 値が 11.6 から 7.9 へ Tyr 64 の pK 値が 3 以下に低下し、それぞれの pK 値の低下量の差がプロトン輸送の方向と量子収率を決めている。」

このモデルに従うと、これまで報告されている実験事実がよく説明される。また、Tyr 26（又は 43）や Tyr 64 がニトロ化されると pK 値はそれだけで 2.6 程低下するが、それらのチロシン残基がニトロ化されたバクテリオロドプシンの光プロトンポンプの pH 依存性も低 pH 側へ移動する事実もこの提出されたモデルの妥当性を示している。

本研究で提出されたモデルは、バクテリオロドプシンの研究だけでなく、生体におけるエネルギー変換機構を分子レベルでの理解に大きく寄与する。よって、武田一男提出の本博士論文は本人が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、理学博士の学位論文として合格と認める。